

Swope, Sheridan

From: Swope, Sheridan
Sent: Friday, December 12, 2003 5:49 PM
To: Slobodyansky, Elizabeth
Subject: 09712338

I have an article that describes purification of the protein in my instant application.
I want to know if they did any peptide sequencing of the purified protein.
From looking at it, I don't think they did. But I'm not sure bc its in Russian.
Would you be willing to take a quick look at it?

Sheridan Swope, Ph.D.
Patent Examiner, AU 1652
Recombinant Enzymes
sheridan.swope@uspto.gov
703-305-1696 (voice)
703-308-3014 (FAX)
Mailbox: CM1 Rm10D01
Office: CM1 Rm12D12

125 33137

Record: 475327

<u>Accession Number</u>	475327
<u>Borrower</u>	Sheridan Swope
<u>Organization</u>	1652
<u>Phone</u>	305-1696
<u>SER</u>	09712338
<u>Request Date</u>	12/12/2003
<u>JRDAT</u>	2879
<u>Document Type</u>	Journal article
<u>Journal Name</u>	BIOKHIMIJA
<u>Journal Location</u>	AGL; NIST; NLM; PTO; TRIDOC
<u>Title</u>	ISOLATION
<u>Author</u>	AZARENKOVA
<u>volume</u>	41
<u>Issue</u>	1
<u>Pages</u>	20-6
<u>Year</u>	1976
<u>Publisher</u>	?, ? : MOSCOW
<u>NOTES</u>	SECOND copy, ex did not get it, 472133
<u>Alternate Source</u>	DL/D 12/12/2003
<u>Workdays</u>	-2879
<u>ISSN</u>	0006-307X

942 547

УДК 577.156.2

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА КИСЛОЙ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ ИЗ *ASPERGILLUS ORYZAE*

Н. М. АЗАРЕНКОВА, Т. Н. ВАГАНОВА, А. Я. СТРОИГИН
и В. М. СТЕПАНОВ

Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Из оризына — смеси ферментов, продуцируемых грибом *Aspergillus oryzae*, последовательным применением солевого фракционирования, гель-фильтрации на сефадексе G-75, хроматографии на амберлите IRC-50, гидроксилапатите, ДЭАЭ-целлюлозе и электрофореза в полиакриламидном геле выделена карбоксипептидаза с оптимумом действия на пептидные субстраты при pH 4—5. Молекулярный вес фермента, определенный при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, равен 37 000. Фермент обладает широкой субстратной специфичностью, но не обладает дипептидазной и эстеразной активностью. Кислая карбоксипептидаза из *Asp. oryzae* не является металлоферментом, инактивируется специфическими ингибиторами сериновых протеиназ и соединениями, блокирующими сульфгидрильные группы. По-видимому, фермент содержит функционально важные остатки серина и цистеина и принадлежит к особому классу протеиназ — кислым карбоксипептидазам.

В последние годы появились работы, посвященные выделению кислых карбоксипептидаз растительного происхождения, которые обладают широкой специфичностью. Кислые карбоксипептидазы выделены из оранжевого слоя кожуры цитрусовых [1], листьев фасоли [2], проростков ячменя [3], семян хлопка [4], пекарских дрожжей [5], плесневых грибов рода *Aspergillus* [6—13] и из *Penicillium janthinellum* [14]. Характеристика этих ферментов еще не завершена, однако ясно, что они относятся к особому классу ферментов. В 1969 г. [15] высказано предположение, что во внутриклеточном метаболизме существенная роль может принадлежать экзопептидазам с широкой субстратной специфичностью. Не исключено, что кислые карбоксипептидазы выполняют эту функцию, хотя прямых экспериментальных подтверждений этой гипотезы пока нет.

Данная работа посвящена выделению и свойствам кислой карбоксипептидазы из *Asp. oryzae*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве исходного препарата для выделения кислой карбоксипептидазы использовали препарат оризин (Московский ферментный завод), представляющий собой смесь ферментов, продуцируемых плесневым грибом *Asp. oryzae*.

Определение активности кислой карбоксипептидазы [16]. К 4 мл 0,35 мМ ДНФ-Gly-Gly-Arg в 0,1 М ацетатном буфере, pH 5,6, прибавляли 1 мл раствора фермента и смесь инкубировали 1 час при 37°. Из-за гигроскопичности субстрата его концентрацию устанавливали по поглощению при 360 мμ, принимая, что $\epsilon_{360}^{1\%1\text{см}} = 15\,000$. Реакцию останавливали снижением pH до 2,0, добавляя 0,7 мл 1 н. HCl. Образовавшийся ДНФ-Gly-Gly экстрагировали 5 мл этилацетата, содержащего 10% этилового спирта. Этилацетатный слой отделяли и экстрагировали 4 мл 1%-ного раствора бикарбоната натрия. Оптическую плотность раствора ДНФ-Gly-Gly в бикарбонате натрия определяли при 360 мμ в спектрофотометре СФ-4. Контрольный опыт проводили в тех же условиях, не добавляя фермента.

20

Активность кислой карбоксипептидазы определяли, используя 0,37 мМ раствор субстрата. Активность аминопептидазы определяли по методу [17]. Для колориметрического определения активности карбоксипептидазы использовали диазотированный *p*-анилин. Гидролиз пептидов кислой карбоксипептидазы проводили при 37°. К 1 мл пиридин-ацетатного буфера, pH 5,6, прибавляли 0,1 мл раствора фермента и 0,350 мл субстрата. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 1 н. HCl. Образовавшийся пептид определяли по поглощению при 360 мμ. Реакцию проводили в тех же условиях, не добавляя фермента.

Определение активности кислой карбоксипептидазы проводили по методу [18]. Для определения активности кислой карбоксипептидазы использовали 0,37 мМ раствор субстрата. Для колориметрического определения активности карбоксипептидазы использовали диазотированный *p*-анилин. Гидролиз пептидов кислой карбоксипептидазы проводили при 37°. К 1 мл пиридин-ацетатного буфера, pH 5,6, прибавляли 0,1 мл раствора фермента и 0,350 мл субстрата. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 1 н. HCl. Образовавшийся пептид определяли по поглощению при 360 мμ. Реакцию проводили в тех же условиях, не добавляя фермента.

Изоэлектрическое фокусирование проводили по методу [19], используя 0,37 мМ раствор субстрата. Для колориметрического определения активности карбоксипептидазы использовали диазотированный *p*-анилин. Гидролиз пептидов кислой карбоксипептидазы проводили при 37°. К 1 мл пиридин-ацетатного буфера, pH 5,6, прибавляли 0,1 мл раствора фермента и 0,350 мл субстрата. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 1 н. HCl. Образовавшийся пептид определяли по поглощению при 360 мμ. Реакцию проводили в тех же условиях, не добавляя фермента.

Выделение кислой карбоксипептидазы проводили по методу [20]. Для колориметрического определения активности карбоксипептидазы использовали диазотированный *p*-анилин. Гидролиз пептидов кислой карбоксипептидазы проводили при 37°. К 1 мл пиридин-ацетатного буфера, pH 5,6, прибавляли 0,1 мл раствора фермента и 0,350 мл субстрата. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 1 н. HCl. Образовавшийся пептид определяли по поглощению при 360 мμ. Реакцию проводили в тех же условиях, не добавляя фермента.

Фракции, которые были элюированы с ДЭАЭ-целлюлозой, собирали, обессоливали и концентрировали. Дальнейшую очистку проводили по методу [21]. Для колориметрического определения активности карбоксипептидазы использовали диазотированный *p*-анилин. Гидролиз пептидов кислой карбоксипептидазы проводили при 37°. К 1 мл пиридин-ацетатного буфера, pH 5,6, прибавляли 0,1 мл раствора фермента и 0,350 мл субстрата. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 1 н. HCl. Образовавшийся пептид определяли по поглощению при 360 мμ. Реакцию проводили в тех же условиях, не добавляя фермента.

УДК 577.156.2

И КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ S ORYZAE

НОВА, А. Я. СТРОНГИН
И НОВ

ский институт генетики
и организмов, Москва

цируемых грибом *Aspergillus* левого фракционирования, гели на амберлите IRC-50, гидролиза в полиакриламидном геле действия на пептидные субстраты, определенный при помощи в присутствии додецилсульфата широкой субстратной специфичности эстеразной активностью. Кислая является металлоферментом, инаксериновых протеиназ и соединенных. По-видимому, фермент серина и цистеина и принадлежит карбоксипептидазам.

посвященные выделению кислых пептидазы, которые обладают широким спектром действия, выделены из орехов фасоли [2], проростков ячменя [5], плесневых грибов рода *Aspergillus* [14]. Характеристика пока ясно, что они относятся к карбоксипептидазам. Высказано предположение, что активная роль может принадлежать специфичности. Не исключают эту функцию, хотя и этой гипотезы пока нет. о и свойствам кислой карбокси-

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Кислой карбоксипептидазы (используя завод), представляющий собой смесь белков. Для определения активности карбоксипептидазы [16]. К 4 мл 0,35 мМ ДНФ-буфера прибавляли 1 мл раствора фермента. Активность субстрата его концентрации принимая, что $\epsilon_{280}^{1\%} = 15000$. Реакцию проводили в течение 10 мин при 37°. Образовавшийся продукт, содержащий 10% этилового спирта, экстрагировали 4 мл 1%-ного раствора бикарбоната натрия. Гидролиз пептидов кислой карбоксипептидазой проводили в течение 18 часов при 37°. К 1 мл пиридин-ацетатного буфера, pH 5,15, содержащего по 100 мМ каждого пептида, прибавляли 0,1 мл раствора фермента, 1 мл которого имел поглощение при 280 нм 0,350. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 1 н. HCl до pH 2,0. Раствор упаривали и отщепившиеся аминокислоты определяли в аминокислотном анализаторе Bio-Cal BC-200 (США).

Активность кислой карбоксипептидазы с ДНФ-Gly-Gly-Lys определяли аналогично, используя 0,37 мМ раствор субстрата в 0,1 М ацетатном буфере, pH 5,6.

Активность аминопептидазы определяли по гидролизу L-лейцил-β-нафтиламина [17]. Для колориметрического определения отщепившегося β-нафтиламина применяли сочетание с диазотированным L-анилином [18].

Гидролиз пептидов кислой карбоксипептидазой проводили в течение 18 часов при 37°. К 1 мл пиридин-ацетатного буфера, pH 5,15, содержащего по 100 мМ каждого пептида, прибавляли 0,1 мл раствора фермента, 1 мл которого имел поглощение при 280 нм 0,350. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 1 н. HCl до pH 2,0. Раствор упаривали и отщепившиеся аминокислоты определяли в аминокислотном анализаторе Bio-Cal BC-200 (США).

Определение активности кислой карбоксипептидазы по расщеплению карбонафтокси-D,L-фенилаланина проводили по ранее описанному методу [18].

Определение эстеразной активности по расщеплению метилового эфира N-бензил-L-аргинина проводили спектрофотометрически по изменению поглощения при 258 нм (спектрофотометр DW-2, Aminco). За эстеразную активность по расщеплению метилового эфира ДНФ-Gly-Gly-Arg следили электрофоретически. 10 мМ метилового эфира ДНФ-Gly-Gly-Arg инкубировали с 0,1 мл фермента ($E_{260} = 0,230$) в пиридин-ацетатном буфере, pH 5,6, в течение 2,5 часов при 37°. Реакцию останавливали добавлением 1 н. HCl до pH 2,0, после чего пробу количественно переносили на электрофореграмму. Электрофорез проводили в пиридин-ацетатном буфере, pH 5,6, в течение 1 часа при градиенте потенциала 45 в/см. Пятна с электрофореграммы вырезали, элюировали 4 мл 1%-ного бикарбоната натрия, и плотность раствора измеряли при 360 нм.

Изоэлектрическое фокусирование в градиенте плотности проводили по методу Вестерберга и Свенссона [19], используя колонку 110 мл (LKB, Швеция). Градиент pH создавали с помощью 1,5–2,0% смеси амфотеринов pH 3–5. Изоэлектрофокусирование в 5%-ном полиакриламидном геле проводили в диапазоне pH 3–5 по Ригли [20].

Молекулярный вес фермента определяли электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Подвижность белка в геле рассчитывали относительно бромфенолового синего. Для построения калибровочной линии использовали цитохром c, миоглобин, хомотрипсиноген, пепсин и овальбумин (хроматографически чистый пепсин получен в нашей лаборатории, все остальные белки фирмы «Serva», ФРГ). Перед опытом белки инкубировали 2 часа при 37° в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,1, содержащем 1%-ный додецилсульфат натрия и 1% меркаптоэтанол. Маркер — бромфеноловый синий — добавляли непосредственно в электродный буфер. Окрашивание гелей проводили 0,3%-ным хумасом голубым GL («Serva», ФРГ) в смеси метанол — вода — ледяная уксусная кислота (50:50:10) в течение ночи после фиксации в течение 1 часа в 10%-ной трихлоруксусной кислоте. Избыток красителя удаляли 7,5%-ной уксусной кислотой.

Выделение кислой карбоксипептидазы. К 50 г орехов прибавляли 350 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 3,9. Смесь подкисляли уксусной кислотой до pH 5,4, центрифугировали при 3000 об/мин и осадок отбрасывали. Все операции по выделению фермента проводили при 5°. К центрифугату при постоянном перемешивании добавляли сернокислый аммоний до 50%-ного насыщения. Осадок отделяли центрифугированием и отбрасывали. Раствор белка диализовали против 0,01 М ацетатного буфера, pH 4,8. При диализе и во всех последующих операциях ко всем растворам добавляли цистеин до конечной концентрации 1 мМ для предотвращения инактивации фермента.

600 мл полученного диализата наносили на колонку с сефадексом G-75 («Pharmacia», Швеция). Колонку (8×70 см) уравнивали и элюировали 0,01 М ацетатным буфером, pH 4,8. Кислая карбоксипептидаза элюировалась сразу же после свободного объема колонки. Основная масса пигментов элюировалась позже. Белок во фракциях определяли при 280 нм в спектрофотометре СФ-4.

На колонку с амберлитом IRC-50 (4,5×25 см), уравнированную 0,01 М ацетатным буфером, pH 4,8, наносили 1400 мл раствора белка, полученного на предыдущей стадии. Колонку промывали 1 л 0,01 М ацетатного буфера, pH 4,8, и карбоксипептидазу элюировали 0,5 М ацетатным буфером, pH 5,6. Элюат (1500 мл) концентрировали в 100 раз ультрафильтрацией («Amicon», Голландия) через мембрану UM-10 и обессоливали на колонке с сефадексом G-25. К полученному раствору белка добавляли 0,2 М фосфатный буфер, pH 6,85, до конечной концентрации 0,001 М и 10 мл раствора наносили на колонку (3×10 см) с гидроксилатитом, который был получен по методике Анакера и Стой [21]. Колонка была уравновешена 0,001 М фосфатным буфером, pH 6,85. Элюцию белка проводили ступенчато: 0,001–0,005–0,01–0,05 М фосфатным буфером, pH 6,85.

Фракции, которые были элюированы 0,05 М фосфатным буфером, pH 6,85, в двух параллельных опытах объединяли (440 мл), обессоливали и наносили на колонку (3×18 см) с ДЭАЭ-целлюлозой («Whatman» DE-32), уравнированную 0,01 М ацетатным буфером, pH 5,6. Элюцию проводили градиентом концентрации (0,1–0,5 М) ацетатного буфера, pH 5,6. Фракции с карбоксипептидазной активностью (320 мл) собирали, обессоливали и концентрировали до 8 мл.

Дальнейшую очистку проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле при pH 5,5 (300–500 мкг белка на гель размером 6×60 мм). Контрольный гель

разрезали на 20 сегментов (по 3 мм), в которых определяли карбоксипептидазную активность. Сегмент, содержащий активный фермент, вырезали из 80 параллельных гелей, измельчали и фермент элюировали 45 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 5,6, в течение ночи при 4° при постоянном перемешивании. Экстракцию ацетатным буфером повторяли трижды. Все экстракты объединяли, концентрировали ультрафильтрацией через мембрану UM-10 и хранили при -20°. В результате проведенной очистки получено 13 мг кислой карбоксипептидазы. При выделении фермента мы не применяли лиофильную сушку, поскольку она вызывала заметную инактивацию. Потеря активности при лиофилизации отмечена также при выделении кислой карбоксипептидазы из пекарских дрожжей [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлен ход очистки кислой карбоксипептидазы из оризина, представляющего собой смесь ферментов, продуцируемых грибом *Asp. oryzae*.

Таблица 1

Очистка кислой карбоксипептидазы из *Asp. oryzae*

Стадии выделения	Общий белок, E ₂₈₀	Активность		Очистка	Выход, % по активности
		общая, мкмоль ДНФ-Gly-Gly	удельная, мкмоль расщепившегося субстрата/E ₂₈₀ /мин		
Исходный раствор	32 840	5578	0,002	1	100
50%-ное насыщение сульфатом аммония	29 000	5888	0,003	1,4	105,5
Гель-фильтрация на сефадексе G-75	8 700	3784	0,0093	4	67,5
Хроматография на амберлите IRC-50	2 420	3508	0,048	8,4	85
Концентрирование, обессоливание	1 826	3328	0,03	12,8	60
Хроматография на гидроксиллаптите	330	628	0,031	13,5	11,3
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	57	340	0,1	42,8	6
Концентрирование, обессоливание	46,8	332	0,12	50	5
Электрофорез в полиакриламидном геле	13	403	0,43	57	1,8

Осаждение сульфатом аммония при 50%-ном насыщении позволило отделить лишь часть сопутствующих белков и даже при 90%-ном насыщении сульфатом аммония в надосадочной жидкости сохранялось 50% карбоксипептидазной активности. Поэтому для отделения основного количества пигментов и балластных белков применяли фильтрацию через сефадекс G-75 и хроматографию на амберлите IRC-50, после чего экстракт фермента концентрировали ультрафильтрацией. Хроматографический раствор фермента концентрировали ультрафильтрацией. Хроматографией на гидроксиллаптите при pH 6,85 (рис. 1) удалось отделить основную массу сопутствующего фермента — лейцинаминопептидазы, которая по своим физико-химическим свойствам близка карбоксипептидазе. Окончательное отделение лейцинаминопептидазы достигнуто последующей хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе при pH 5,6 (рис. 2). В результате получен препарат, который при электрофорезе в полиакриламидном геле (pH 5,5) давал четыре полосы, наиболее интенсивная из которых соответствовала карбоксипептидазе, что дало возможность применить электрофорез в полиакриламидном геле как заключительную стадию очистки. Из 50 г исходного препарата оризина получено 13 мг кислой карбоксипептидазы. В этом препарате обнаружена одна полоса при электрофорезе в полиакриламидном геле при pH 5,5 и 9,5 (рис. 3).

Изoeлектрическая точка кислой карбоксипептидазы, найденная изoeлектрофокусированием, находится при pH 4,4. Молекулярный вес фермента определяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле

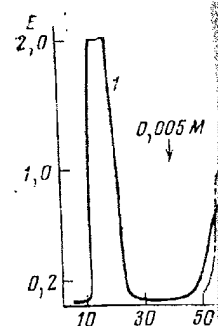


Рис. 1. Хроматография

Колонку (3×10 см) уравновесили. Элюцию проводили, изменяя pH, pH 6,85 (указано стрелкой); 2 — активность карбоксипептидазы (E₂₈₀); 3 — активность

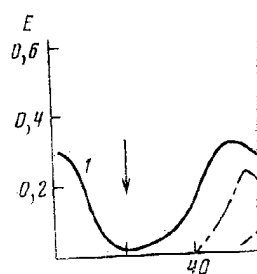


Рис. 2. Хроматография

Колонку (3×18 см) уравновесили. Элюцию градиентом концентрации указано

в присутствии додецилсульфата карбоксипептидазы, расположено соответствует молекулярному

Оптимальное действие кислой карбоксипептидазы на ДНФ-Gly-Gly-Arg находится при pH 4,0, по оптимальному действию от карбоксипептидазы [7] и *Asp. oryzae* [6, 11—13].

При 37° фермент наиболее активен при pH 3,5 и 8,0. Фермент ингибируется за 10 мин инкубации при pH 2,0, при 60° фермент

Выделенный фермент по своим свойствам близок к ферменту из других источников растительного происхождения. Он отщепляет пептиды с N-замещенными дипептидами. Фермент особенно легко отщепляет основные аминокислоты

рых определяли карбоксипептидазную фермент, вырезали из 60 параллельных 0,1 М ацетатного буфера, pH 5,6, в течение 10 мин. Экстракцию ацетатным буфером концентрировали ультрафильтрацией. В результате проведенной очистки полученный фермент мы не применяли лиофильную инактивацию. Потеря активности и кислой карбоксипептидазы из пекар-

ОБСУЖДЕНИЕ

кислой карбоксипептидазы из грибов, продуцируемых грибом

Таблица 1

кислоты из *Asp. oryzae*

Активность		Очистка	Выход, % по активности
акт. а. мкмоль Ф-Gly-Gly	удельная, мкмоль расщепленного субстрата / E ₂₅₀ /мин		
5578	0,002	1	100
5888	0,003	1,4	105,5
3764	0,0093	4	67,5
3508	0,018	8,4	65
3328	0,03	12,8	60
628	0,031	13,5	11,3
340	0,1	42,8	6
332	0,12	50	5
103	0,13	57	1,8

50%-ном насыщении позволило получить и даже при 90%-ном насыщении жидкости сохранялось 50% фермента для отделения основного компонента применяли фильтрацию через амберлит IRG-50, после чего графитацией. Хроматография (рис. 1) удалось отделить основную карбоксипептидазу, которая по физико-химическим свойствам близка карбоксипептидазе. Окончательная очистка достигнута последующей ионообменной хроматографией при pH 5,6 (рис. 2). В результате сореза в полиакриламидном геле фермент интенсивная из которых соотношение интенсивности применения электрофореза заключительную стадию очистки получено 13 мг кислой карбоксипептидазы, найденная изолята при pH 4,4. Молекулярный вес фермента в полиакриламидном геле

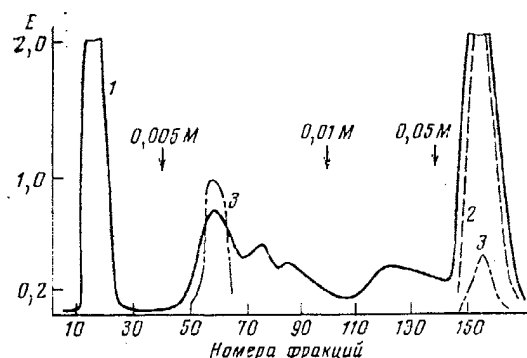


Рис. 1. Хроматография кислой карбоксипептидазы на гидроксилапатите

Колонку (3×10 см) уравнивали 0,001 М фосфатным буфером, pH 6,85. Элюцию проводили, изменяя ступенчато концентрацию фосфатного буфера, pH 6,85 (указано стрелками). Объем фракций — 5,8 мл. 1 — белок (E₂₅₀); 2 — активность карбоксипептидазы по расщеплению ДНФ-Gly-Gly-L-Arg (E₃₆₀) и 3 — активность лейцинаминопептидазы по β-нафтиламиду L-лейцина

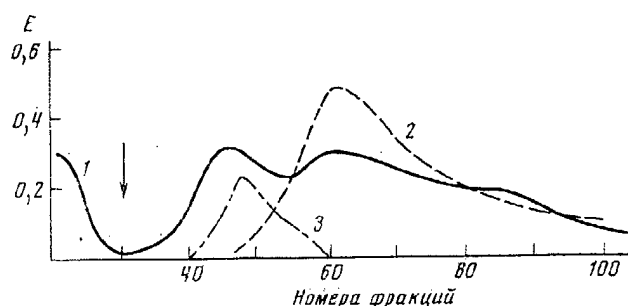


Рис. 2. Хроматография кислой карбоксипептидазы на ДЭАЭ-целлюлозе

Колонку (3×18 см) уравнивали 0,01 М ацетатным буфером, pH 5,6. Элюцию проводили, изменяя ступенчато концентрацию ацетатного буфера (0,1—0,5 М). Начало градиента указано стрелкой. Обозначения — см. подпись к рис. 1

в присутствии додецилсульфата натрия. Зона, соответствующая кислой карбоксипептидазе, расположена между овальбумином и пенцином, что соответствует молекулярному весу ~37 000 (рис. 4).

Оптимум действия кислой карбоксипептидазы по расщеплению ДНФ-Gly-Gly-Arg находится при pH 5,0, а по расщеплению карбокси-окси-Glu-Tyr — при pH 4,0. Выделенный фермент несколько отличается по оптимуму действия от карбоксипептидаз, выделенных из *Asp. saitoi* [7] и *Asp. oryzae* [6, 11—13].

При 37° фермент наиболее стабилен при pH 5,0 и быстро инактивируется при pH 3,5 и 8,0. Фермент мало устойчив к повышению температуры: за 10 мин инкубации при pH 5,0 и 50° активность фермента снижается на 20%, при 60° фермент полностью инактивируется.

Выделенный фермент подобно кислым карбоксипептидазам из других источников растительного происхождения обладает широким спектром действия. Он отщепляет от карбоксильного конца белков, пептидов и N-замещенных дипептидов ряд аминокислот, включая пролин (табл. 2). Фермент особенно легко отщепляет ароматические аминокислоты, а также основные аминокислоты — лизин и аргинин. С наибольшим трудом

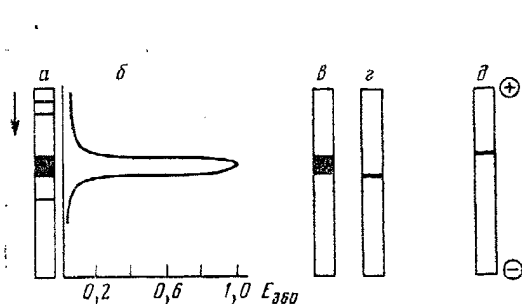


Рис. 3

Рис. 3. Электрофорез кислой карбоксипептидазы в полиакриламидном геле. а — кислая карбоксипептидаза после хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (рН 5,5; 50–100 мкг белка на гель); б — определение карбоксипептидазной активности в сегментах геля по расщеплению ДНФ-Gly-Gly-L-Arg; в — электрофорез препарата, выделенного электрофорезом (рН 5,5; 500–100 мкг белка на гель); г — то же (рН 9,5; 30 мкг белка на гель); д — изоэлектрофокусирование в геле (рН 3–5) фермента, выделенного электрофорезом (50 мкг белка на гель). Направление разделения указано стрелкой

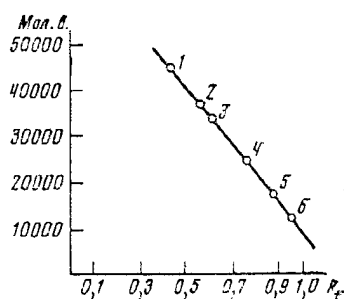


Рис. 4

Рис. 4. Определение молекулярного веса кислой карбоксипептидазы при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. 1 — овальбумин, 2 — кислая карбоксипептидаза, 3 — пепсин, 4 — химотрипсиноген, 5 — миоглобин, 6 — цитохром с

карбоксипептидаза отщепляет глицин и пролин, особенно, если они соседствуют в полипептидной цепи. Так, фермент отщепляет пролин и глицин от бензил-Phe-Pro и ацетил-Phe-Gly, но не гидролизует карбо-бензоксиглицин-Pro и карбобензоксиглицин-Gly. Карбоксипептидаза не гидролизует свободные дипептиды, но легко отщепляет тирозин от трипептида Gly-Glu-Tyr. При гидролизе 12-членного пептида химотрипсинового гидролизата фрагмента В2 свиного пепсина (Glu-Thr-Ile-Gly-Ile-Gly-Thr-Pro-Ala-Gln-Asp-Phe) фермент последовательно отщепляет с С-конца четыре аминокислоты, но не гидролизует связь треонин—пролин. Фермент способен гидролизовать только истинные пептидные связи и не гидролизует карбоэфир-фенилаланин, который является хорошим субстратом для карбоксипептидазы А. Выделенная карбоксипептидаза не обладает эстеразной активностью и не гидролизует метиловый эфир N-бензил-L-аргинина и метиловый эфир ДНФ-Gly-Gly-Arg как при рН 5,0, так и при рН 7,2 и 8,0. Этим свойством фермент отличается от карбоксипептидаз из *Asp. saitoi* [7], проростков семян хлопка [4] и пекарских дрожжей [5], которые способны гидролизовать эфирные субстраты. По данным японских авторов [6, 11–13], I–IV карбоксипептидазы из *Asp. oryzae* очень медленно гидролизуют эфирные субстраты. Кислая карбоксипептидаза, выделенная нами, не гидролизует амид N-бензил-L-аргинина.

Данные о влиянии различных ингибиторов и ионов двухвалентных металлов на кислую карбоксипептидазу представлены в табл. 3. Метал-

Таблица 2

Гидролиз пептидных субстратов карбоксипептидазой
В пробе 100 нмоль пептида, рН 5,15

Субстраты	Отщепилось аминокислоты, нмоль	Субстраты	Отщепилось аминокислоты, нмоль
Cbz-Clu-L-Tyr	99	Ac-D,L-Phe-D,L-Val	47
Bz-L-Phe-L-Arg	86	Gly-Clu-L-Tyr	40
Ac-D,L-Phe-Gly	63	Cbz-Gly-Gly	0
Ac-D,L-Phe-D,L-Phe	51	Cbz-Gly-L-Pro	0
Bz-D,L-Phe-L-Pro	45	Leu-Gly-Gly	0

Влияние различных реагентов

Реагент

ЭДТА
8-оксихинолин
n-XMB
Йодацетат натрия

ДФФ

Фенилметилсульфонилфторид
ZnSO₄
MgSO₄
CaCl₂
MnCl₂
Cu(CH₃COO)₂
Pb(CH₃COO)₂
Hg(CH₃COO)₂
FeSO₄

Сравнительная характеристика

Источники выделения

Карбоксипептидаза из оризина
Карбоксипептидаза из цитрусовых
Карбоксипептидаза из проростков ячменя
Карбоксипептидаза из листьев фасоли
Карбоксипептидаза из семян хлопка
Карбоксипептидаза из пекарских дрожжей
Карбоксипептидаза из *Asp. saitoi*
Карбоксипептидаза I из *Asp. oryzae*
Карбоксипептидаза II из *Asp. oryzae*
Карбоксипептидаза III из *Asp. oryzae*
Карбоксипептидаза IV из *Asp. oryzae*
Пенициллокарбоксипептидаза из *Penicillium janthinellum*

* Молекулярный вес определяли с помощью додецилсульфата натрия, в остальных случаях — по другим методам.

лосвязывающие агенты — ЭДТА и оксихинолин. Очевидно, что карбоксипептидазы А и В кислая карбоксипептидаза не активна в присутствии двухвалентных металлов в активном центре. Ионы Pb²⁺ также не влияют на активность фермента на 50%, а ионы Cu²⁺ снижают активность фермента на 50%. Реагенты на SH-группы, так как натриевая соль йодуксусной кислоты почти полностью. Эти данные являются для активности кислой карбоксипептидазы. Ингибиторы сериновых протеиназ: диизопропилфторфосфат, диизопропилфторфосфат фермента, а фенилметилсуль-

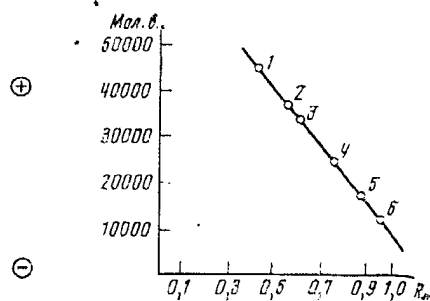


Рис. 4

птидазы в полиакриламидном геле на ДЭАЭ-целлюлозе (рН 5,5; 50—100 мкг белковой активности в сегментах геля по расщеплению зеленого электрофорезом (рН 5,5; 500—100 мкг на геле); 8 — изоэлектрофокусирование в геле мкг белка на геле). Направление разделения вправо

слой карбоксипептидазы при помощи присутствия додецилсульфата натрия пепсин, 4 — химотрипсиноген, 5 — миоглобин, 6 —

и пролин, особенно, если они со- фермент отщепляет пролин и he-Gly, но не гидролизует карбо- Gly. Карбоксипептидаза не гидро- отщепляет тирозин от трипеп- пептида химотрипсина пепсина (Glu-Thr-Ile-Gly-Ile-Gly- медователно отщепляет с С-кон- олизуется связь треонин — пролин. ю истинные пептидные связи и не ин, который является хорошим . Выделенная карбоксипептидаза не гидролизует метиловый эфир ир ДНФ-Gly-Gly-Arg как при рН :твом фермент отличается от кар- стков семян хлопка [4] и пекар- дролизовать эфирные субстраты. 13]. I—IV карбоксипептидазы из уют эфирные субстраты. Кислая не гидролизует амид N-бензоил-L-

абиторов и ионов двухвалентных у представлены в табл. 3. Метал-

Таблица 2

ов карбоксипептидазой моль пептида, рН 5,15

Субстраты	Отщепилось аминокислот, н.моль
D,L-Phe-D,L-Val	47
Glu-Tyr	40
Gly-Gly	0
Gly-L-Pro	0
Gly-Gly	0

Влияние различных реагентов на активность кислой карбоксипептидазы

Реагент	Концентрация, М	Время ингибирования, часы	рН	Остаточная активность, %
ЭДТА	$5 \cdot 10^{-3}$	1	5,0	100
8-оксихинолин	10^{-3}	0,5	5,6	110
n-XMB	10^{-3}	1	7,4	6,8
Йодацетат натрия	$4 \cdot 10^{-3}$	1	5,0	6,6
		0,5	5,0	3,0
		1	7,4	4,0
		0,5	7,4	6,0
ДФФ	$4 \cdot 10^{-3}$	1	7,4	2,6
		1	5,6	3,8
Фенилметилсульфонилфторид	10^{-3}	1	5,0	20
ZnSO ₄	10^{-4}	1	5,6	90
MgSO ₄	10^{-4}	1	5,6	100
CaCl ₂	10^{-4}	1	5,6	92
MnCl ₂	10^{-4}	1	5,6	93
Cu(CH ₃ COO) ₂	10^{-3}	1	5,0	15
Pb(CH ₃ COO) ₂	10^{-3}	1	5,0	97
Hg(CH ₃ COO) ₂	10^{-3}	1	5,0	2
FeSO ₄	10^{-3}	1	5,0	56

Таблица 4

Сравнительная характеристика класса кислых карбоксипептидаз

Источник выделения	Оптимум рН	Гидролиз эфиров	Инактивация			Мол. в.
			ЭДТА	n-XMB	ДФФ	
Карбоксипептидаза из орзизина	5,0	—	—	+	+	37 000*
Карбоксипептидаза из цитрусовых	5,3—5,7	+	—	—	+	148 700
Карбоксипептидаза из проростков яч-меня	5,2	+	—	+	+	90 000
Карбоксипептидаза из листьев фасоли	5,6	—	—	—	+	—
Карбоксипептидаза из семян хлопка	5,8	+	—	—	+	84 500
Карбоксипептидаза из пекарских дрожжей	5,0	+	—	+	+	61 000
Карбоксипептидаза из <i>Asp. saitoi</i>	3,1—3,5	+	—	+	—	155 000
Карбоксипептидаза I из <i>Asp. oryzae</i>	3,0	±	—	+	+	120 000
Карбоксипептидаза II из <i>Asp. oryzae</i>	3,0	±	—	+	+	105 000
Карбоксипептидаза III из <i>Asp. oryzae</i>	3,0	±	—	+	+	61 000
Карбоксипептидаза IV из <i>Asp. oryzae</i>	3,0	±	—	+	+	43 000
Пенициллокарбоксипептидаза из <i>Penicillium janthinellum</i>	4,0—5,0	—	—	+	+	48 000

* Молекулярный вес определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, в остальных случаях — при помощи геле-фильтрации на сефадексе G-100.

лосвязывающие агенты — ЭДТА и 8-оксихинолин — не ингибируют активность фермента. Очевидно, что в отличие от панкреатических карбоксипептидаз А и В кислая карбоксипептидаза не содержит ионов двухвалентных металлов в активном центре. Ионы Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Pb^{2+} также не влияют на активность фермента. Ионы Fe^{2+} ингибируют фермент на 50%, а ионы Cu^{2+} и Hg^{2+} являются сильными ингибиторами. Реагенты на SH-группы, такие, как n-хлормеркурибензоат (n-XMB) и натриевая соль йодуксусной кислоты, ингибируют активность фермента почти полностью. Эти данные указывают на то, что SH-группы существенны для активности кислой карбоксипептидазы из *Asp. oryzae*. Ингибиторы сериновых протеиназ являются сильными ингибиторами фермента: диизопропилфторфосфат (ДФФ) полностью ингибирует активность фермента, а фенилметилсульфонилфторид — на 80%.

При сравнении полученного фермента с кислыми карбоксипептидазами из других источников растительного происхождения наблюдается много общих черт. Для них характерен широкий спектр действия, оптимум действия в кислой зоне pH и инактивация ДФФ (табл. 4). Присутствие серина в активном центре было прямо показано при исследовании карбоксипептидаз из листьев фасоли и частично очищенной пептидазы из пекарских дрожжей [22]. Шоу и Велс [22], используя меченый ДФФ, показали, что ингибитор присоединяется в ферменте к остатку серина, который входит в состав трипептида Glu-Ser-Tyr. Позднее Хаяши с сотр. [23], выделив карбоксипептидазу из пекарских дрожжей, выделили 15-членный пептид следующего строения: His-Ile-Ala-Gly-Glu-Ser-Tyr-Ala-His-Gly-Tyr-Ile-Pro-Val-Phe, который содержал активный остаток серина и последовательность аминокислот вокруг этого остатка были теми же, что и в карбоксипептидазе из листьев фасоли. Как видно из табл. 4, большинство кислых карбоксипептидаз инактивируется *n*-ХМБ. Это дает основание считать, что ферменты содержат остаток цистеина, существенный для активности. Однако тот факт, что по крайней мере два представителя этого класса ферментов не ингибируются реагентом на SH-группу, не позволяет считать остаток цистеина непосредственно входящим в активный центр кислых карбоксипептидаз. По-видимому, кислые карбоксипептидазы растительного происхождения по специфичности и характеру активного центра представляют собой особую группу ферментов и относятся к классу сериновых протеиназ.

Авторы благодарят Е. А. Тимохину за проведение аминокислотных анализов, С. В. Беляева за помощь при проведении опытов по определению эстеразной активности и Е. Д. Левина за помощь при обсуждении работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zuber H., Z. Physiol. Chem., 349, 1337, 1968.
2. Wells J. R. E., Biochem. J., 97, 228, 1965.
3. Moeller M., Robbins G. S., Burger W. C., Prentice N., J. Agric. Food Chem., 18, 886, 1970.
4. Ihle J. N., Dure L. S., J. Biol. Chem., 247, 5041, 1972.
5. Hayashi R., Moore S., Stein W., J. Biol. Chem., 248, 2296, 1973.
6. Nakadai T., Nasuno S., Yguchi N., Agr. Biol. Chem., 36, 1343, 1972.
7. Ichishima E., Biochim. et biophys. acta, 258, 274, 1972.
8. Ваганова Т. И., Азиренкова Н. М., Люблинская Л. А., Степанов В. М., Химия природн. соед., № 1, 134, 1972.
9. Ваганова Т. И., Азиренкова Н. М., Ластовецкая Л. В., Матер. Всес. симп. по химии протеолитических ферментов, стр. 75, Вильнюс, 1973.
10. Ichishima E., Yomogida K., Agr. Biol. Chem., 37, 693, 1973.
11. Nakadai T., Nasuno S., Yguchi N., Agr. Biol. Chem., 36, 1473, 1972.
12. Nakadai T., Nasuno S., Yguchi N., Agr. Biol. Chem., 36, 1481, 1972.
13. Nakadai T., Nasuno S., Yguchi N., Agr. Biol. Chem., 37, 1237, 1973.
14. Jones S. R., Hofmann T., Canad. J. Biochem., 50, 1297, 1972.
15. Cohen D., J. Theor. Biol., 24, 126, 1969.
16. Люблинская Л. А., Ваганова Т. И., Пасхина Т. С., Степанов В. М., Биохимия, 38, 790, 1973.
17. Green M. N., Kwan-Chung Tsou, Bressler K., Seligman A. M., Arch. Biochem. and Biophys., 57, 458, 1955.
18. Степанов В. М., Грейль Т. И., Биохимия, 28, 540, 1963.
19. Vesterberg O., Svensson H., Acta chem. scand., 20, 820, 1966.
20. Rigley C. W., Sci. Tools, 15, 17, 1968.
21. Anacker W. F., Stoy V., Biochemische Z., 380, 141, 1958.
22. Shaw D. C., Wells J. R. E., Biochem. J., 128, 229, 1972.
23. Hayashi R., Moore S., Stein W. H., J. Biol. Chem., 248, 8366, 1973.

Поступила в редакцию
29.V.1974

ISOLATION AND PROPERTIES FROM ASPEN

N. M. AZARENKOVA, T. I. VAGANOVA
Institute of Genetics and S

Carboxypeptidase with pH optimum obtained from «oryzine», the enzyme was isolated by means of successive salt fractionation and polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme was purified by means of polyacrylamide gel electrophoresis and found to be a monomer of molecular weight 25,000. The enzyme has a substrate specificity and does not require cofactors. Acid carboxypeptidase from aspen is inactivated by specific inhibitors. The enzyme contains an important serine and cysteine residue.